

سنتز نانو دندریمر پلی‌آمیدوآمین - G7 و ارزیابی تاثیر ضد باکتریایی آن بر روی باکتری‌های مختلف در محیط آزمایشگاهی

چکیده

دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۲۴ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۲/۰۱ ویرایش: ۱۳۹۵/۰۲/۲۵ آنلاین: ۱۳۹۵/۰۲/۳۰

زمینه و هدف: هدف از پژوهش کنونی سنتز و بررسی اثرات ضد باکتریایی نانو دندریمر پلی‌آمیدوآمین-G7 در حذف باکتری‌های اشرشیاکلی، پروتئوس میرابیلیس، سالمونلا تیفی، باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس در محیط آزمایشگاهی بود.

روش بررسی: مطالعه به‌صورت تجربی در تیرماه ۱۳۹۴ در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی ایران انجام گردید. اثر ضدباکتریایی نانو دندریمر پلی‌آمید و آمین-G7 به‌روش انتشار دیسک و رقت لوله‌ای بر روی گونه‌های استاندارد باکتریایی گرم منفی و گرم مثبت انجام شد. حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی بر روی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت بر اساس دستورکارهای موسسه استاندارد و آزمایشگاه پزشکی به‌دست آورده شد.

یافته‌ها: قطر هاله عدم رشد در غلظت $25 \mu\text{g/ml}$ از نانو دندریمر پلی‌آمید و آمین-G7 برای اشرشیاکلی، پروتئوس میرابیلیس، سالمونلا تیفی، باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس به‌ترتیب برابر ۲۶، ۳۸، ۳۶ و ۲۲ mm و به‌دست آمد. در مورد قطر هاله عدم رشد بین باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت اختلاف معناداری مشاهده نشد ($P=0/16$). حداقل غلظت بازدارندگی برای باکتری‌های پروتئوس میرابیلیس، باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی برابر $0/25 \mu\text{g/ml}$ و برای باکتری سالمونلا تیفی برابر $0/25 \mu\text{g/ml}$ می‌باشد. حداقل غلظت کشندگی نانو دندریمر برای باکتری سالمونلا تیفی برابر ۲۵، برای باکتری‌های پروتئوس میرابیلیس و باسیلوس سوبتیلیس برابر $50 \mu\text{g/ml}$ و برای استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی برابر $100 \mu\text{g/ml}$ به‌دست آمد.

نتیجه‌گیری: نتایج پژوهش کنونی نشان می‌دهد، دندریمر پلی‌آمیدوآمین-G7 در حذف باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت بسیار موثر است.

کلمات کلیدی: آزمایشات حساسیت میکروبی، عامل ضدباکتریایی، PAMAM، پلی‌آمیدوآمین، دندریمرها.

میترا غلامی^۱، شهرام نظری^{۲*}

مهدی فرزادکیا^۱، سید محسن محسنی^۳

سودابه علیزاده متبوع^۴

فخرالدین اکبری دورباش^۵

میثم حسن‌نژاد^۶

۱- گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

۲- گروه مهندسی بهداشت محیط، عضو کمیته تحقیقات دانشجویی دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

۳- گروه بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران.

۴- گروه بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران.

۵- گروه مهندسی مواد، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

۶- گروه باکتری‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: تهران، اتوبان همت، دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده بهداشت، گروه مهندسی بهداشت
تلفن: ۰۲۱-۸۷۰۴۶۳۳

E-mail: shahramnazari73@yahoo.com

مقدمه

در گزارش انجمن ملی مراقبت از عفونت بیمارستانی، شایع‌ترین عفونت بیمارستانی مطابق گذشته شامل عفونت دستگاه ادراری، پنومونی و عفونت زخم جراحی بوده و موارد باکتریایی به‌ویژه با وسایل داخل عروقی و عفونت با میکروب‌های مقاوم افزایش یافته است.^۱ ۷-۱۰٪ بیماران بستری در طول سال به عفونت‌های بیمارستانی مبتلا می‌شوند و هر بیمار به‌طور میانگین ۵-۴ روز بیشتر در بیمارستان بستری می‌شود.^۲ اهمیت این عفونت‌ها به‌ویژه در افرادی که تحت عمل جراحی قرار گرفته و یا بیمارانی که آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌طیف یا

عفونت بیمارستانی به‌صورت عفونت‌های حاصل از بستری شدن در بیمارستان تعریف می‌گردند.^۱ از آنجا که دوره نهفته بیماری به‌طور متوسط ۲-۳ روز است، بنابراین عفونت‌های بیمارستانی پس از ۴۸ یا ۷۲ ساعت اول بستری شدن در بیمارستان خود را نشان می‌دهند و بیماری عفونی که پیش از ۴۸ ساعت از بستری شدن علایم آن آشکار شود، به‌طور معمول جزو عفونت‌های بیمارستانی محسوب نمی‌شوند.^۲

اما هم‌اکنون ایزوپروپیل ۷۰٪ و ۹۰٪ به‌عنوان بهترین ماده‌ی گندزدای معمولی برای اسباب و وسایل، سطوح پوستی و غیره مطرح می‌باشد.^{۱۰} اما با گذشت زمان و تبخیر الکل از قدرت ضدعفونی آن کاسته می‌شود و پس از مدتی تنها رنگ الکل باقی می‌ماند و دیگر نمی‌تواند به‌عنوان ماده ضدعفونی‌کننده مورد استفاده قرار گیرد.^{۱۱} بعضی از پلیمرها مانند نانو دندریمرها دارای خاصیت ضد باکتریایی می‌باشند که در مقایسه با سایر عوامل ضد باکتریایی موجود کارایی بالاتری دارند.^{۱۲}

نانو دندریمرها گروهی از ماکرومولکول‌ها هستند که دارای ساختار شاخه‌ای با نظم بالا، شکل فشرده، تعداد گروه انتهایی فعال خیلی زیاد هستند و فضای بین شاخه‌های آن‌ها محل مناسبی برای حضور مولکول‌های میزبان می‌باشد.^{۱۳} امروزه پژوهش درباره نانو دندریمرها در سه بخش شامل سنتز نانو دندریمرهای جدید، سنتز نانو دندریمرها با نسل‌های بالاتر و استفاده از این ترکیب‌ها در صنایع مختلف در حال انجام است.^{۱۴، ۱۵} برخی ویژگی‌های نانو دندریمرها باعث افزایش کاربردهای آن‌ها در زمینه زیستی شده است.^{۱۶، ۱۷} دو دسته از پرکاربردترین نانو دندریمرها پلی‌پروپیلن ایمن و پلی‌آمیدوآمین می‌باشد که تا نسل ششم به‌صورت تجاری هم وجود دارند.^{۱۸}

تعداد گروه‌های انتهایی نانو دندریمرهای پلی‌آمیدوآمین با هسته اتیلن‌دی‌آمین با افزایش هر نسل دو برابر می‌شود. با بالا رفتن نسل نانو دندریمر تراکم شاخه‌ها افزایش می‌یابد. با افزایش قطر از نسل اول تا نسل هفتم، شکل و اندازه نانو دندریمرها بسیار شبیه به پروتیین‌های کروی می‌شود. وزن مولکولی و قطر نانو دندریمر NPAMAM-G7 مشابه پپتیدها و پروتیین‌های هم‌اندازه می‌باشد. بر خلاف پروتیین‌ها، همچنان‌که اندازه نانو دندریمرها افزایش می‌یابد، سطح‌شان به‌صورت فزاینده‌ای متراکم می‌شود. علت آن دو برابر شدن شاخه‌ها و گروه‌های متصل به سطح خارجی به ازای هر افزایش نسل می‌باشد. با افزایش نسل و اندازه نانو دندریمر مولکول‌ها متقارن‌تر و کروی‌تر می‌شوند و علت آن تراکم پوشش شاخه‌های خارجی می‌باشد.^{۱۹}

گروه‌های سطحی که به مولکول‌های نانو دندریمر متصل می‌شوند بسیار متنوع و شامل آمین، کربوکسیلات، هیدروکسیل و متیل استر است. نانو دندریمرهای پلی‌آمیدوآمین با گروه انتهایی آمینی اثر ضد

داروهای تضعیف‌کننده سیستم ایمنی مصرف می‌نمایند بسیار چشمگیر می‌باشد.^۴ ۹۰٪ از عفونت‌های بیمارستانی توسط باکتری‌ها ایجاد می‌گردد، عوامل ویروسی، قارچی یا پروتوزوا نقش کمتری دارند. از جمله مهمترین عوامل مسبب عفونت بیمارستانی /شرشیاکلی، کلبسیلا پنومونیه، استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا تیفی، سودوموناس آئروژینوزا و گونه‌های پروتئوس می‌باشد.^۵

از میان این باکتری‌ها شایع‌ترین مولد عفونت‌های بیمارستانی، انتروباکتریاسه‌های فرصت‌طلب هستند (به‌خصوص /شرشیاکلی) که در روده انسان زندگی می‌کنند و می‌توانند در صورت انتقال به مناطق استریل بدن باعث عفونت شوند.^۲ پروتئوس میرابیلیس عامل ۱۰٪ از عفونت‌های دستگاه ادراری به‌حساب می‌آید و پنجمین عامل شایع عفونت‌های دستگاه ادراری بیمارستانی است.^۶ گاستروانتریت حاد، تب روده‌ای تیفوئید یا پاراتیفوئید و عفونت‌های سیستمیک، از جمله موارد ایجاد شده توسط سرواتیپ‌های سالمونلا تیفی موربورم هستند. از ویژگی‌های مهم این گونه، توانایی آن در باقی ماندن به شکل قابل تکثیر و زنده به‌مدت طولانی در محیط و نمونه‌های غذایی است.^۷ از آنجا که درمان عفونت بیمارستانی هزینه‌ی زیادی را به بخش درمان کشور تحمیل می‌کند، به‌نظر می‌رسد اجرای یک برنامه کنترل عفونت و یا حتی تغییر کوچکی ولی موثر در عملکرد دست اندرکاران بخش درمان در جهت کنترل عفونت‌های بیمارستانی می‌تواند از دیدگاه اقتصاد سلامت، بسیار مفید و مقرون به‌صرفه باشد.^۸

ضدعفونی‌کننده‌ها و گندزادهای شیمیایی در بیمارستان‌ها، کلینیک‌های درمانی و مطب‌ها برای کنترل اشیای آلوده و بهداشتی نمودن آن‌ها برای مصارف بعدی، کاهش بار آلودگی میکروبی وسایل و دستگاه‌های مورد مصرف و جلوگیری از گسترش میکروارگانیسم‌های پاتوژن به‌کار می‌روند. ضد عفونی‌کننده‌های مورد مصرف بایستی برعلیه کوکسی‌های گرم مثبت، باسیل‌های گرم منفی، باسیل‌های گرم مثبت اسپوردار و میسلیوم‌های قارچی دارای قدرت اثربخشی مؤثر باشند.^۹

مواد ضد عفونی‌کننده که مصارف زیادی در مراکز بهداشت و سلامت دارند عبارتند از: الکل‌ها، ترکیبات آمونیم چهار ظرفیتی، ترکیبات حاوی کلر، گلو تارآلدئید، یدفورها و ترکیبات فنولیک. الکل اتانول ۷۰٪ در دمای °C ۳۰ باکتری‌ها را طی مدت ۲-۱ دقیقه می‌کشد. ولی در غلظت‌های بالاتر و پایین‌تر از این، تاثیر کمتری دارد.

انتهایی به NH₂ تبدیل می‌شود) می‌باشد که به‌طور متناوب تکرار می‌شوند. واکنش افزودن Michael متیل‌اکریلات به اتیلن‌دی‌آمین در متانول، نانو دندریمرهای نسل نیم با گروه‌های انتهایی استر (OH) را که تحت عنوان G0.5 نامیده می‌شوند به‌دست می‌دهد. واکنش کامل Amidation این نانو دندریمرهای با انتهای استری در حضور میزان زیاد اتیلن‌دی‌آمین در متانول، نانو دندریمرهای نسل کامل با انتهای آمین را که منتسب به Gn می‌باشند به‌دست می‌دهد. تکرار واکنش‌های افزودن Michael و Amidation، نانو دندریمرهای نسل بالاتر بعدی را به‌دست می‌دهد. در پژوهش کنونی، نانو دندریمرهای PAMAM بر اساس روش زیر سنتز گردید.^{۲۴}

اتیلن‌دی‌آمین (g ۱۰ یا ۰/۱۶۶ مول) در ۱۰۰ ml متانول و در داخل یک بالن ته‌گرد حل شد. متیل‌اکریلات (g ۹۴/۶ یا ۰/۷۵۱ مول) در دمای °C ۴۰ اضافه شد و سیستم تحت نیتروژن به‌مدت ۲۴ ساعت هم زده شد. متیل‌اکریلات اضافی تحت خلا و در دمای اتاق حذف شد. یک واکنش افزودن Michael بین آمین و اکریلات محصولی با چهار گروه متیل استر انتهایی به‌دست می‌دهد که تحت عنوان G0.5 NPAMAM تعریف می‌شود. سپس، اتیلن‌دی‌آمین (g ۱۲۰ یا ۲ مول) در متانول حل شده و به G0.5 NPAMAM اضافه و پس از هم زدن به‌مدت ۴۸ ساعت تحت نیتروژن و حذف واکنش‌گرهای اضافی توسط تقطیر خلا، محصولی به‌دست آمد که دارای چهار گروه انتهایی آمین بوده و تحت عنوان NPAMAM-G1 تعریف می‌شود. با تکرار چرخه‌ی بالا، نانو دندریمرهای PAMAM نسل بالاتر سنتز شدند. ویژگی‌های شیمیایی نانو دندریمر PAMAM-G7 در جدول ۱ نشان داده شده است.

سویه‌های باکتری استفاده شده در پژوهش کنونی شامل باکتری‌های گرم منفی /اشرشیاکلی، پروتئوس میرابیلیس، سالمونلا تیفی و گرم مثبت باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد که از مرکز پژوهش‌های صنعتی ایران خریداری گردید. تمامی سوش‌های باکتریایی خریداری شده، در محیط کشت Nutrient Broth, NB در شرایط هوازی

باکتریایی بالایی دارد.^{۱۳} دگرگونی‌های الکترواستاتیکی میان بخش آنیونی سطح سلول باکتری و بخش کاتیونی نانو دندریمر باعث می‌شود تا به سرعت با یکدیگر در تماس قرار گیرند. نفوذپذیری غشای میکروارگانیسم بسته به غلظت نانو دندریمر تغییر پیدا می‌کند و سرانجام منجر به اختلال در دیواره سلولی و مرگ باکتری می‌شود.^{۲۰،۱۹}

پژوهش‌هایی نشان داده است که نانو دندریمرها به‌دلیل شباهتی که با برخی از پروتئین‌های بدن دارند، حداقل سمیت را برای سلول‌های یوکاریوتیک دارند،^{۲۲،۲۱} بنابراین ارزیابی خاصیت ضد باکتریایی نانو دندریمرها و امکان استفاده از آن‌ها به‌عنوان عامل ضد باکتریایی می‌تواند مورد پژوهش قرار گیرد. به‌دلیل اینکه ۹۰٪ از عفونت‌های بیمارستانی توسط باکتری‌ها ایجاد می‌گردد و این باکتری‌ها به‌طور دایم در حال مقاوم شدن به انواع ضد باکتری‌ها می‌باشند،^۹ پژوهش کنونی با هدف تعیین اثر ضد باکتریایی نانو دندریمر پلی‌آمیدوآمین نسل هفتم (Nano polyamidoamine-G7- NPAMAM-G7) بر روی باکتری‌های /اشرشیاکلی، پروتئوس میرابیلیس، سالمونلا تیفی، باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس انجام شد.

روش بررسی

مطالعه به‌صورت تجربی و در مقیاس آزمایشگاهی انجام شد. پژوهش کنونی در تیرماه ۱۳۹۴ در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی ایران انجام گردید. نانو دندریمرهای PAMAM با هسته‌ی اتیلن‌دی‌آمین توسط روش Tomalia و روش رشد واگرا سنتز می‌شوند.^{۲۳} سنتز شامل دو واکنش متوالی تشکیل زنجیره می‌باشد که شامل واکنش کامل افزودن Michael (Michael addition) یک واکنش است که به اسم مایکل و کاشف آن نامگذاری شده است) و واکنش کامل Amidation addition (Amidation addition) یک واکنش است که تحت عنوان "افزودن آمیداسیون" شناخته می‌شود که در این فرآیند OH

جدول ۱: ویژگی‌های شیمیایی نانو دندریمر پلی آمیدوآمین-G7

فرمول مولکولی	نسل نانو دندریمر	وزن مولکولی (g/mol)	اندازه (nm)	تعداد گروه‌های انتهایی آمین	تعداد گروه‌های آمین داخلی
C ₅₁₀₂ H ₁₀₂₀₈ N ₂₀₄₂ O ₁₀₂₀	۷	۱۱۶۴۹۳	۸/۸	۵۱۲	۵۱۰

استفاده گردید. به دلیل رقیق‌سازی این ماده ضد میکروبی، بهتر است از روش دیسک دیفیوژن برای ارزیابی این ماده ضد میکروبی استفاده شود. به همین خاطر در پژوهش کنونی از روش دیسک دیفیوژن برای تعیین قطر هاله عدم رشد استفاده گردید. دیسک‌های خالی (Blank) 6mm disk در شرایط کاملاً استریل به $50 \mu\text{l}$ از غلظت‌های مختلف نانو دندریمر PAMAM-G7 آغشته و به منظور خشک شدن به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور در دمای 30°C قرار داده شد و سپس دیسک‌ها در داخل پلیت‌ها به فاصله مناسب قرار گرفته و پس از گرم‌خانه‌گذاری به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C قطر هاله‌ی عدم رشد به وسیله خط‌کش برای هر کدام از آن‌ها اندازه‌گیری و بر حسب میلی‌متر گزارش گردید. تعداد کل نمونه‌ها برای قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها در غلظت‌های مختلف نانو دندریمر، با توجه به احتساب چهار غلظت نانو دندریمر، پنج باکتری مورد مطالعه و سه بار تکرار برابر ۶۰ عدد به دست آمد.

برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی از روش رقت لوله‌ای استفاده شد. در این روش از هفت لوله برای غلظت‌های مختلف نانو دندریمر PAMAM-G7 و یک لوله‌ی شاهد برای کنترل مثبت و یک لوله‌ی شاهد برای کنترل منفی استفاده شد. شاهد مثبت شامل محیط کشت و باکتری که ماده ضد باکتریایی به آن اضافه نشده بود.

همچنین شاهد منفی شامل محیط کشت حاوی ماده ضد باکتریایی بدون باکتری بود. به دلیل تعیین مقدار دقیق حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی هر باکتری، ادامه آزمایشات با غلظت‌های مختلف (۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲٫۵، ۳۱٫۲۵، ۱۵٫۶۲۵، ۷٫۸۱۲۵، ۳٫۹۰۶۲۵ و $200 \mu\text{g/ml}$) نانو دندریمر PAMAM-G7 انجام داده شد. به لوله‌های آزمایش ۹ ml از محیط کشت NB، ۰/۵ ml از غلظت‌های مختلف نانو دندریمر PAMAM-G7 و ۰/۵ ml از رقت باکتریایی معادل ۰/۵ مک‌فارلند اضافه گردید. سپس لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C در انکوباتور گرم‌خانه‌گذاری شدند. پس از طی زمان انکوباسیون، لوله‌ها از نظر کدورت ناشی از رشد باکتری تلقیح شده بررسی شدند.

لوله‌ای با کمترین غلظت از نانو دندریمر که رشد باکتری در آن مشاهده نشد، به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی انتخاب شد. برای تعیین حداقل غلظت کشندگی نانو دندریمر، از لوله‌هایی که رشد در آن‌ها مشاهده نشده بود بر روی محیط کشت Nutrient Agar، NA

و به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C گرم‌خانه‌گذاری شدند. سپس با لوپ استریل از محیط کشت NB مقداری برداشته و بر روی محیط‌های کشت اختصاصی هر باکتری، به حالت خطی کشت داده شد. سپس محیط‌ها به حالت وارونه در انکوباتور با دمای 37°C به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند.^{۲۰} تمامی محیط کشت‌های مورد استفاده ساخت (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) بود. در این پژوهش، استاندارد مک‌فارلند به عنوان مرجعی برای مطابقت دادن کدورت ناشی از سوسپانسیون باکتری استفاده شد.^{۲۱} مواد مورد استفاده برای تهیه استاندارد نیم مک‌فارلند شامل: باریم کلرید ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)، دهیدراته و اسید سولفوریک (H_2SO_4) بوده که از شرکت Merck تهیه شدند. با مخلوط نمودن ۰/۰۵ ml باریم کلرید دهیدراته ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ۱/۱۷۵٪ با ۹/۹۵ ml اسید سولفوریک (H_2SO_4) ۱٪، استاندارد نیم مک‌فارلند تهیه گردید. با مخلوط این دو ترکیب رسوب سولفات باریم که سبب ایجاد کدورت در محلول می‌شود، به وجود آمد.

از آنجایی که تعداد باکتری تلقیح شده یکی از مهمترین متغیرهایی است که بر نتیجه این پژوهش اثر می‌گذارد، تراکم سوسپانسیون میکروبی تلقیحی باید استاندارد باشد. بدین منظور برای تهیه سوسپانسیون میکروبی، از کشت تازه و جوان باکتری با استفاده از سوآپ استریل چند کلنی به لوله حاوی سرم فیزیولوژی استریل منتقل شده، و پس از هم زدن محلول، کدورت حاصله در مقابل چراغ مطالعه با کدورت محلول نیم مک‌فارلند که توسط ورتکس هم زده می‌شود، مقایسه گردید. این عملیات برای همه باکتری‌های مورد مطالعه به طور جداگانه انجام گردید. از کدورت سوسپانسیون میکروبی تهیه شده مطابق با استاندارد نیم مک‌فارلند در پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار به وسیله سوآپ استریل به صورت یکنواخت کشت داده شدند.

از نانو دندریمر مادر، غلظت‌های ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲٫۵، ۳۱٫۲۵ و $200 \mu\text{g/ml}$ با استفاده از آب مقطر استریل شده به روش رقیق‌سازی سریالی تهیه شدند. برای تعیین اثر ضد باکتریایی نانو دندریمر PAMAM-G7، از روش دیسک دیفیوژن برای تعیین قطر هاله عدم رشد (Zone of Inhibition-ZON) و از روش رقت لوله‌ای برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) و حداقل غلظت کشندگی (Minimum Bactericidal Concentration, MBC)

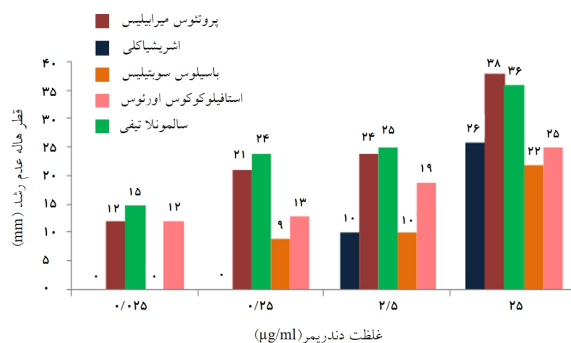
غلظت $0.025 \mu\text{g/ml}$ بر روی باکتری‌های پروتئوس میرابیلیس، سالمونلا تیفی و استافیلوکوکوس اورئوس اثرگذار بود و هیچ‌گونه اثری بر روی اشرشیاکلی و باسیلوس سوبتیلیس نداشت (نمودار ۱).

حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی نانو دندریمر برای هر یک از باکتری‌ها مورد مطالعه به‌دست آورده شد.

همان‌طور که جدول ۲ نشان می‌دهد، حداقل غلظت بازدارندگی برای پروتئوس میرابیلیس، باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی برابر $0.025 \mu\text{g/ml}$ و برای سالمونلا تیفی برابر $0.025 \mu\text{g/ml}$ می‌باشد. حداقل غلظت کشندگی نانو دندریمر برای سالمونلا تیفی برابر ۲۵، برای باکتری‌های پروتئوس میرابیلیس و باسیلوس سوبتیلیس برابر $50 \mu\text{g/ml}$ و برای استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی به‌ترتیب برابر $100 \mu\text{g/ml}$ به‌دست آمد.

بیشترین مقدار حداقل غلظت کشندگی مربوط به اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد، به‌عبارتی از میان باکتری‌های مورد مطالعه، اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس مقاومت بالایی در برابر نانو دندریمر دارد. کمترین مقدار حداقل غلظت بازدارندگی ($0.025 \mu\text{g/ml}$) و حداقل غلظت کشندگی ($0.025 \mu\text{g/ml}$) مربوط به سالمونلا تیفی می‌باشد. به‌عبارتی این باکتری حساسیت بالا و مقاومت کمتری در برابر نانو دندریمر دارند. نمودار ۲ مشخصات نانو دندریمر PAMAM-G7 که از طریق Fourier Transform Infrared Spectroscopy (Bruker Optics GmbH, Ettlingen, Germany) اندازه گرفته شده است را نشان می‌دهد.

پیک‌های نشان داده شده در نمودار ۲ به موارد زیر اختصاص دارد:



نمودار ۱: قطر هاله‌ی عدم رشد باکتری‌ها در غلظت‌های مختلف نانو دندریمر PAMAM-G7

کشت داده شدند و در انکوباتور در دمای 37°C به‌مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند. پس از گرم‌خانه‌گذاری پلیت مربوط به لوله‌ای که حاوی کمترین غلظت از نانو دندریمر در آن بود و رشد باکتری در آن مشاهده نشد، به‌عنوان MBC در نظر گرفته شد. تمامی آزمایش‌ها برابر با دستورکارهای موسسه‌ی استاندارد و آزمایشگاه پزشکی (Clinical Laboratory and Standard Institute, CLSI) انجام شد.^{۲۵} از SPSS software, version 14 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) برای سنجش آماری داده‌ها و از Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) برای رسم نمودارها استفاده گردید. برای تعیین اختلاف قطر هاله عدم رشد در باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت از Mann-Whitney U test استفاده گردید.

یافته‌ها

نتایج حاصل از تاثیر غلظت‌های مختلف نانو دندریمر PAMAM-G7 بر روش دیسک دیفیوژن در نمودار ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد نانو دندریمر PAMAM-G7 از رشد باکتری‌های گرم منفی اشرشیاکلی، پروتئوس میرابیلیس، سالمونلا تیفی و باکتری‌های گرم مثبت باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس جلوگیری نموده و از نظر قطر هاله عدم رشد بین باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت تفاوت معناداری وجود نداشت ($P=0.16$). این اثر بازدارندگی بر روی باکتری‌ها با افزایش غلظت نانو دندریمر، افزایش یافت که به‌صورت قطر هاله‌ی عدم رشد مشاهده گردید.

بیشترین قطر هاله عدم رشد برای پروتئوس میرابیلیس و سالمونلا تیفی در غلظت $25 \mu\text{g/ml}$ نانو دندریمر به‌ترتیب برابر ۳۶ و ۳۵ mm به‌دست آمد و در تمامی غلظت‌های مورد مطالعه، این دو باکتری، نسبت به سایرین از قطر هاله عدم رشد بالایی برخوردار بودند. به‌عبارتی بیشترین حساسیت را در برابر نانو دندریمر داشتند. غلظت‌های $0.025 \mu\text{g/ml}$ و $0.25 \mu\text{g/ml}$ نانو دندریمر هیچ تاثیری بر روی باکتری اشرشیاکلی نداشت و فقط در غلظت ۲/۵ و $25 \mu\text{g/ml}$ نانو دندریمر به‌ترتیب ۱۰ و ۲۶ mm قطر هاله عدم رشد مشاهده گردید. همچنین باکتری باسیلوس سوبتیلیس نیز مقاومت به‌نسبت بالایی در برابر نانو دندریمر PAMAM-G7 داشت به‌طوری که در غلظت‌های ۲/۵ و $25 \mu\text{g/ml}$ قطر هاله عدم رشد آن کمتر از اشرشیاکلی بود.

جدول ۲: حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی نانو دندریمر PAMAM-G7 برای باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت

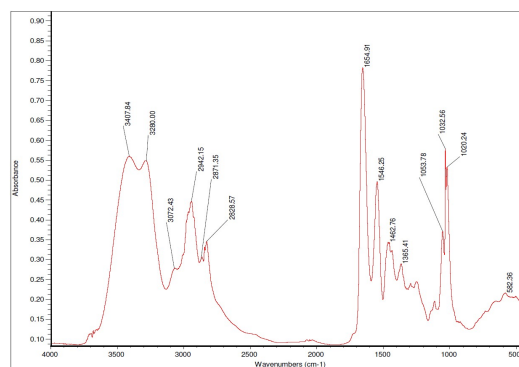
تاثیر بر رشد باکتری‌ها					
غلظت نانو دندریمر PAMAM-G7 (µg/ml)	اشرشیاکلی	پروتئوس میرابلیس	سالمونلا تیفی	باسیلوس سوبتیلیس	استافیلوکوکوس اورئوس
شاهد (کنترل منفی)	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد
شاهد (کنترل مثبت)	رشد	رشد	رشد	رشد	رشد
۰/۰۲۵	رشد	رشد	حد اقل غلظت بازدارندگی	رشد	رشد
۰/۲۵	حد اقل غلظت بازدارندگی	حد اقل غلظت بازدارندگی	بازدارندگی	حد اقل غلظت بازدارندگی	حد اقل غلظت بازدارندگی
۲/۵	بازدارندگی	باکتریواستاتیک	بازدارندگی	بازدارندگی	بازدارندگی
۲۵	بازدارندگی	باکتریواستاتیک	حد اقل غلظت کشندگی	بازدارندگی	بازدارندگی
۵۰	بازدارندگی	حد اقل غلظت کشندگی	باکتری کشی	حد اقل غلظت کشندگی	بازدارندگی
۱۰۰	حد اقل غلظت کشندگی	باکتری کشی	باکتری کشی	باکتری کشی	حد اقل غلظت کشندگی
۲۰۰	باکتری کشی	باکتری کشی	باکتری کشی	باکتری کشی	باکتری کشی

پیک در $1032/56 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به ارتعاش کششی گروه‌های C-O می‌باشد. دو پیک در $1645/91 \text{ cm}^{-1}$ و $1546/25 \text{ cm}^{-1}$ به ترتیب مربوط به ارتعاشات کششی C=O (آمید I) و خمیدگی N-H یا ارتعاشات کششی C-N (آمید II) ساختار داخلی نانو دندریمر اختصاص می‌یابد. ارتعاشات انرژی پایین‌تر گروه‌های متیلن، پراکندگی و حالت‌های تغییر

شکل نامتقارن H-C-H به ترتیب در پیک‌های $1462/78 \text{ cm}^{-1}$ و $1325/41 \text{ cm}^{-1}$ دیده می‌شود. پیک‌ها در $2942/57 \text{ cm}^{-1}$ و $2858/30 \text{ cm}^{-1}$ به کشش C-H نسبت داده می‌شود. باندها در $3427/24 \text{ cm}^{-1}$ و $3380/00 \text{ cm}^{-1}$ به ترتیب به حالت کششی گروه‌های آمین اولیه و آمید اختصاص می‌یابد.^{۲۸،۲۷}

بحث

در پژوهش کنونی از نانو دندریمر PAMAM-G7 برای ارزیابی تاثیر آن بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی استفاده شد که نشان داد نانو دندریمر PAMAM-G7 خاصیت ضد باکتریایی بسیار مناسبی در حذف باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت دارد. همچنین با افزایش غلظت نانو دندریمر از ۰/۰۲۵ تا $25 \mu\text{g/ml}$ قطر هاله عدم رشد برای تمامی باکتری‌ها به‌طور چشمگیر افزایش یافت. در مطالعه‌ای که در مورد اثر ضد باکتریایی نانو دندریمر PAMAM-G4 به‌روش دیسک دیفیوژن انجام شده بود، به این نتیجه رسیدند که نانو دندریمر PAMAM-G4 بر روی اشرشیاکلی، باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس اثر ضد باکتریایی



نمودار ۲: طیف سنجی تبدیل فوری مادون قرمز نانو دندریمر PAMAM-G7

پتاسیم و مواد هسته‌ای مانند RNA و DNA از سلول آزاد می‌شوند که در نتیجه باعث مرگ سلول باکتریایی می‌شود. پس می‌توان گفت خاصیت ضد میکروبی نانو دندریمرها به واسطه اختلال در غشاء داخلی و خارجی باکتری‌ها که از طریق گروه‌های انتهایی آمینی صورت می‌گیرد، می‌باشد.^{۱۹}

همچنین نتایج مطالعه (نمودار ۱) نشان داد، نانو دندریمر PAMAM-G7 حتی در غلظت $0.25 \mu\text{g/ml}$ نیز خاصیت ضد باکتریایی به نسبت مناسبی بر روی باکتری‌های پروتئوس/میرابیلیس، سالمونلا تیخی و استافیلوکوکوس اورئوس دارد. به احتمال این می‌تواند به دلیل خاصیت درخت‌سانی، ساختار منظم و پرشاخه، فضاهای خالی ما بین شاخه‌ها، تعداد زیاد گروه‌های عاملی انتهایی و ماکرو مولکول بودن نانو دندریمر PAMAM-G7 باشد. این ویژگی‌ها سبب افزایش سطح ویژه نانو دندریمرها می‌شود و با افزایش هر نسل سطح ویژه افزایش پیدا می‌کند. بالا بودن سطح ویژه به نانو دندریمرها اجازه فعالیت در سطح بیشتری را می‌دهد، در نتیجه با غلظت کمتر نیز می‌تواند کارایی بالاتری داشته باشد.^{۲۲}

همان‌طور که در نمودار ۱ نشان داده شده است، از لحاظ کیفی اشرشیاکلی نسبت به باکتری‌های باسیلوس سوبتیلیس، استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا تیخی و پروتئوس/میرابیلیس در مقابل عامل ضد باکتریایی از مقاومت بالاتری برخوردار است و فقط در غلظت‌های $2/5$ و $25 \mu\text{g/ml}$ نانو دندریمر هاله عدم رشد داشت. بیشترین مقدار حداقل غلظت کشندگی مربوط به باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی می‌باشد. از لحاظ کمی این دو باکتری بیشترین مقاومت را در برابر نانو دندریمر داشتند.

مطالعات زیادی نشان داده‌اند که اشرشیاکلی شایع‌ترین باکتری عفونت‌زا در محیط‌های بیمارستانی می‌باشد که اغلب منجر به عفونت دستگاه ادراری می‌شود.^{۳۰،۳۱} و همچنین در مطالعاتی نشان داده شده است که باکتری اشرشیاکلی مقاومت بالایی در برابر دیسک‌های آغشته شده به آمپی‌سیلین، آمیکاسین، پیراسیلین^{۳۲} و نانو دندریمر پلی‌آمید و آمین نسل چهارم دارد. نانو دندریمر پلی‌آمید و آمین نسل چهارم در غلظت $500 \mu\text{g/ml}$ بر روی باکتری اشرشیاکلی اثرگذار بود.^{۲۲} نتایج این پژوهش‌ها با نتایج پژوهش کنونی مطابقت دارد. پس می‌توان گفت احتمال تاثیر کمتر غلظت‌های پایین نانو دندریمر PAMAM-G7 بر روی اشرشیا نسبت به سایر باکتری‌های مورد مطالعه می‌تواند به دلیل

دارد، ولی بر روی آنتروباکترکلوآکه هیچ‌گونه اثر ضد باکتریایی ندارد و قطر هاله عدم رشد در غلظت $500 \mu\text{g/ml}$ نانو دندریمر برای اشرشیاکلی، آنتروباکترکلوآکه، باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب برابر ۱۴، صفر، ۳۵ و ۲۹ mm بود. همچنین نشان داده شد اثر ضد باکتریایی نانو دندریمر PAMAM-G4 در غلظت‌های بالاتری اتفاق می‌افتد.^{۲۲}

در مطالعه‌ای دیگر که در مورد اثر ضد باکتریایی نانو دندریمر PAMAM-G4 و پلی پروپیلین ایمن نسل دوم به روش دیسک دیفیوژن انجام داده شده بود، دریافتند که هاله عدم رشد در غلظت $500 \mu\text{g/ml}$ از نانو دندریمر PAMAM-G4 برای کلبسیلا/وکسی‌توکا، پروتئوس/میرابیلیس و سودوموناس آنروژینوزا به ترتیب برابر ۲۰، ۱۸ و صفر میلیمتر بود و در غلظت $500 \mu\text{g/ml}$ از نانو دندریمر پلی پروپیلین ایمن نسل دوم هاله عدم رشد برای کلبسیلا/وکسی‌توکا، پروتئوس/میرابیلیس و سودوموناس آنروژینوزا به ترتیب برابر ۲۵، ۱۵ و ۲۰ mm بود.

همچنین پژوهش کنونی آشکار کرد غلظت‌های ۰/۵، ۵ و $50 \mu\text{g/ml}$ نانو دندریمر PAMAM-G4 هیچ‌گونه تاثیری بر روی کلبسیلا/وکسی‌توکا، پروتئوس/میرابیلیس و سودوموناس آنروژینوزا ندارد.^{۱۷} در مطالعه‌ای که در مورد تاثیر ضد باکتریایی نانو ذرات Fe_3O_4 ، ZrO_2 ، Al_2O_3 ، MgO و CeO_2 بر روی باکتری کلبسیلا انجام شده بود، قطر هاله عدم رشد در غلظت $50 \mu\text{g/ml}$ به ترتیب برابر ۸، ۶، ۶، ۹ و ۸ mm بود.^{۲۹}

همان‌طور که نمودار ۱ نشان می‌دهد غلظت‌های ۰/۲۵، $2/5$ و $25 \mu\text{g/ml}$ نانو دندریمر PAMAM-G7 نیز خاصیت ضد باکتریایی بسیار مناسبی دارد. تاثیر ضد باکتریایی بالاتر نانو دندریمر PAMAM-G7 نسبت به نسل‌های پایین‌تر را می‌توان به تعداد بیشتر گروه انتهایی آمینی آن‌ها نسبت داد. هر چه قدر تعداد گروه انتهایی آمینی بیشتر باشد به همان نسبت خاصیت باکتری‌کشی نانو دندریمر افزایش خواهد یافت. تعداد گروه‌های انتهایی آمینی در نانو دندریمر نسل چهارم برابر ۶۴ عدد در حالی که این تعداد در نانو دندریمر PAMAM-G7 برابر ۵۱۲ عدد می‌باشد.^{۱۵}

این گروه‌های عاملی بر روی سطوح سلول باکتریایی جذب شده و از طریق دیوار سلولی نفوذ می‌نمایند. سپس به غشاء سیتوپلاسمی متصل شده و غشاء سیتوپلاسمی را متلاشی می‌کنند. پس از متلاشی شدن غشاء سیتوپلاسمی، الکترولیت‌هایی مانند یون‌های فسفات و

وزن مولکولی پایین، برعلیه باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *شرشیاکلی* مورد بررسی قرار گرفته بود. نتایج مطالعه نشان داد در بیشتر نانو دندریمرهای پتیدی مورد بررسی، تاثیر نانو دندریمر بر باکتری *شرشیاکلی* ضعیف‌تر از *استافیلوکوکوس اورئوس* بوده است.^{۳۶}

در یک بررسی که در مورد اثر ضد باکتریایی نانو ذرات اکسید روی، دی‌اکسید سیلیکون و دی‌اکسید تیتانیوم بر باکتری‌های *باسیلوس سوبتیلیس* و *شرشیاکلی* انجام شده بود، نشان داد که بیشترین حساسیت نسبت به نانو ذرات مربوط به *باسیلوس سوبتیلیس* می‌باشد.^{۳۷}

این مساله که در بعضی مطالعات باکتری‌های گرم مثبت به‌عنوان گونه‌های حساس‌تر شناخته می‌شوند و در بعضی دیگر، خلاف این موضوع اثبات می‌شود، علاوه بر تفاوت در ویژگی‌های فردی و سویه‌ای باکتری‌ها، می‌تواند به‌خاطر اثر نور نیز باشد، به‌طوری که در مورد TiO_2 اثبات شده است، امواج نوری باعث تولید گونه‌های اکسیژن فعال (Reactive Oxygen Species, ROS) فتوکاتالیتیک می‌شوند و از این طریق سمیت آن‌ها افزایش می‌یابد.^{۳۸} بنابراین مکانیسم پاسخ‌های متفاوت به دوزهای مشابه نانو ذرات در باکتری‌های گرم منفی و مثبت علاوه بر تفاوت فیزیولوژیکی، متابولیسم‌های درون باکتریای و نفوذپذیری انتخابی غشاهای دیواره‌ای آن‌ها، به‌خاطر تفاوت در شرایط فیزیکی (وجود یا عدم وجود نور) نیز می‌تواند باشد. پس به‌احتمال نقطه هدف ماده ضد باکتریایی با مقیاس نانو فقط دیواره سلولی (گرم مثبت یا گرم منفی) نیست.^{۳۹}

بر اساس نتایج پژوهش کنونی نانو دندریمر PAMAM-G7 برای حذف باکتری‌های گرم منفی *شرشیاکلی*، پروتئوس *میرابیلیس*، *سالمونلا تیفی* و باکتری‌های گرم مثبت *باسیلوس سوبتیلیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* موثر می‌باشد و در غلظت‌های پایین‌تر نیز اثر ضد باکتریایی مناسبی بر روی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت داشت.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی تحت عنوان "بررسی تاثیر ضد باکتریایی دندریمر پلی‌آمیدوآمین-G7 بر روی برخی از باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت" مصوب دانشگاه علوم پزشکی ایران در سال ۱۳۹۴ به کد طرح ۹۴-۰۲-۱۹۳-۲۶۲۱۱ می‌باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران اجرا شده است.

مقاومت بالای آن در مقابل ماده ضد باکتریایی باشد. با این حال پژوهش کنونی نشان داد نانو دندریمر PAMAM-G7 می‌تواند از رشد این باکتری نیز به‌خوبی ممانعت کند.

همان‌طور که جدول ۲ نشان می‌دهد، حداقل غلظت بازدارندگی باکتری‌های گرم مثبت *باسیلوس سوبتیلیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مشابه حداقل غلظت بازدارندگی باکتری‌های گرم منفی پروتئوس *میرابیلیس* و *شرشیاکلی* می‌باشد ($0/25 \mu\text{g/ml}$)، ولی حداقل غلظت کشندگی باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* بالاتر از باکتری‌های گرم منفی پروتئوس *میرابیلیس* و *سالمونلا تیفی* و برابر *شرشیاکلی* می‌باشد. علاوه بر این باکتری‌های گرم مثبت قطر هاله عدم رشد کمتری در همه غلظت‌های نانو دندریمر نسبت به باکتری‌های گرم منفی پروتئوس *میرابیلیس* و *سالمونلا تیفی* داشتند. حتی در غلظت $25 \mu\text{g/ml}$ نانو دندریمر، قطر هاله عدم رشد باکتری‌های گرم مثبت کمتر از *شرشیاکلی* بود.

در مطالعه‌ای که خواص ضد میکروبی نانو ذرات نقره و اکسید روی در حالت منفرد و ترکیب با یکدیگر بررسی شده بود، نتایج مطالعه نشان داد سویه‌های گرم منفی نسبت به سویه‌های گرم مثبت در مقابل ترکیب دو نانو ذره حساسیت بیشتری دارند.^{۳۶} در یک بررسی که اثر نانو ذرات اکسید روی بر رشد باکتری‌های *باسیلوس سوبتیلیس* و *شرشیاکلی* O157:H7 انجام شده بود به این نتیجه رسیدند که باکتری گرم مثبت *باسیلوس سوبتیلیس* مقاومت بیشتری نسبت به باکتری گرم منفی *شرشیاکلی* O157:H7 دارد.^{۳۷}

در یک بررسی انجام شده در مورد اثرات ضد میکروبی نانو ذرات اکسید روی به این نتیجه رسیدند که مقاومت *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشتر از *شرشیاکلی* می‌باشد و حداقل غلظت کشندگی به‌ترتیب برای *شرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* برابر 1250 و $5000 \mu\text{g/ml}$ بود.^{۳۸} علت مقاوم بودن باکتری‌های گرم مثبت به وجود لایه‌ی پتیدوگلیکانی ضخیم در این باکتری‌ها نسبت داده می‌شود. تفاوت اصلی باکتری‌های گرم مثبت و منفی در دیواره سلولی و مقدار ماده سازنده غشا پتیدوگلیکان آن‌ها است. ضخامت پتیدوگلیکان در باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از گرم منفی است.^{۳۹} بنابراین انتظار می‌رود که مقاومت بیشتری در مقابل عوامل ضد میکروبی از خود نشان دهند. با این حال، در برخی مطالعات نتایجی عکس نتایج فوق گزارش شده است. در یک مطالعه خاصیت ضد باکتریایی نانو دندریمرهای پتیدی با

References

- Zobeiri M, Karami Matin B. Determining of microbial contamination and its related factors in hands of ICU staff in the hospitals of Kermanshah (2002). *J Kermanshah Univ Med Sci* 2005;9(2):52-7.
- Burke JP. Infection control: a problem for patient safety. *N Engl J Med* 2003;348(7):651-6.
- Toulabi T, Janani F, Qurbanmohammadi E. The appropriateness of educational programs' objectives for professional needs: The viewpoints of Khorramabad School of Nursing and Midwifery Graduates. *Iran J Med Edu* 2009;8(2):263-73.
- Torres A, Aznar R, Gatell JM, Jiménez P, González J, Ferrer A, et al. Incidence, risk, and prognosis factors of nosocomial pneumonia in mechanically ventilated patients. *Am Rev Respir Dis* 1990;142(3):523-8.
- Jain A, Singh K. Recent advances in the management of nosocomial infections. *JK Sci* 2007;9(1):3-8.
- O'Fallon E, Gautam S, D'Agata EM. Colonization with multidrug-resistant gram-negative bacteria: prolonged duration and frequent cocolonization. *Clin Infect Dis* 2009;48(10):1375-81.
- Ranjbar R, Sarshar M. Genetic diversity of clinical strains of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Mil Med* 2012;14(2):143-7.
- Duque AS, Ferreira AF, Cezario RC, Gontijo Filho PP. Nosocomial infections in two hospitals in Uberlandia, Brazil. *Rev Panam Infectol* 2007;9(4):14-8.
- Eskandarloo A, Yousefi Mashouf R. The evaluation of bacterial contamination of active radiography apparatus in dental centers of Hamadan City. *J Hamadan Univ Med Sci* 2006;12(4):55-9.
- Roshaliza HM, Liu CY, Joanna OS. Can the use of 70% isopropyl alcohol swab or aspiration using 5 microm Filter Straw reduce bacterial contamination of fentanyl solution used for regional anaesthesia? *Med J Malaysia* 2011;66(2):92-4.
- Jokar A, Mohebi Z, Gamaznejad S, Sharifi M. A Comparison of Efficacy of Isopropyl Alcohol and Ethanol in Disinfection Programs in Pediatrics Ward and Neonatal Intensive Care Unit. *Hayat* 2009;15(3):52-58.
- Izanloo H, Jebelli MA, Mjidi G, Khazaei M, Tashayoe HR, Vazirirad V, et al. The antibacterial effect of polypropylenimine-G2 dendrimer on *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Bacillus subtilis*, and *Staphylococcus aureus*. *J Qom Univ Med Sci* 2014;8(4):34-43.
- Charles S, Vasanthan N, Kwon D, Sekosan G, Ghosh S. Surface modification of poly (amidoamine)(PAMAM) dendrimer as antimicrobial agents. *Tetrahedron Lett* 2012;53(49):6670-5.
- Krishnan GR, Sreekumar K. Synthesis and characterization of polystyrene supported catalytically active poly (amidoamine) dendrimer-palladium nanoparticle conjugates. *Soft Materials* 2010;8(2):114-29.
- Hermanson GT. Bioconjugate Techniques. 3rd ed. New York, NY: Elsevier Saunders; 2013. p. 351-86.
- Sadeghi Kiakhani M, Arami M, Gharanjig K. Application of chitosan-dendrimer PPI hybrid in direct dyes removal: optimization by RSM, kinetic and isotherm studies. *J Color Sci Tech* 2013;10(6):355-68.
- Izanloo H, Tashauoei HR, Khazaei M, Nazari Sh, Mjidi Gh, Vaziri Rad V and et al. The antimicrobial effects of polypropylenimine-G2 and polyamidoamine-G4 dendrimers on *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus mirabilis*, in vitro experiment. *J Sabzevar Univ Med Sci* 2014;21(5):925-33.
- Abkenar SS, Malek RMA, Mazaheri F. Salt-free dyeing isotherms of cotton fabric grafted with PPI dendrimers. *Cellulose* 2015;22(1):897-910.
- Chen CZ, Cooper SL. Interactions between dendrimer biocides and bacterial membranes. *Biomaterials* 2002;23(16):3359-68.
- Strydom, Rose WE, Otto DP, Liebenberg W, de Villiers MM. Poly(amidoamine) dendrimer-mediated synthesis and stabilization of silver sulfonamide nanoparticles with increased antibacterial activity. *Nanomedicine* 2013;9(1):85-93.
- Felczak A, Wrońska N, Janaszewska A, Klajnert B, Bryszewska M, Appelhans D and et al. Antimicrobial activity of poly (propylene imine) dendrimers. *New J Chem* 2012;36(11):2215-22.
- Izanloo H, Ahmadi Jebelli M, Nazari S, Safavi N, Tashayoe H R, Majidi G, et al . Studying the antibacterial effect of polyamidoamine-G4 dendrimer on some of the gram-negative and gram-positive bacteria. *J Arak Univ Med Sci* 2014;17(9):1-10.
- Esfand R, Tomalia DA. Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications. *Drug Discov Today* 2001;6(8):427-36.
- Tomalia DA, Baker H, Dewald J, Hall M, Kallos G, Martin S, et al. Dendritic macromolecules: synthesis of starburst dendrimers. *Macromolecules* 1986;19(9):2466-8.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial disk diffusion susceptibility tests. 19th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards. *Curr Microbiol* 2015;70(6):907-9.
- Zapata A, Ramirez-Arcos S. A comparative study of McFarland turbidity standards and the Densimat photometer to determine bacterial cell density. *Curr Microbiol* 2015;70(6):907-9.
- Divsar F, Ju H. Electrochemiluminescence detection of near single DNA molecules by using quantum dots-dendrimer nanocomposites for signal amplification. *Chem Commun (Camb)* 2011;47(35):9879-81.
- Priyam A, Blumling DE, Knappenberger KL Jr. Synthesis, characterization, and self-organization of dendrimer-encapsulated HgTe quantum dots. *Langmuir* 2010;26(13):10636-44.
- Ravikumar S, Gokulakrishnan R. The inhibitory effect of metal oxide nanoparticles against poultry pathogens. *Int J Pharmaceutical Sci Drug Res* 2012;4(2):157-9.
- Savas L, Guvel S, Onlen Y, Savas N, Duran N. Nosocomial urinary tract infections: micro-organisms, antibiotic sensitivities and risk factors. *West Indian Med J* 2006;55(3):188-93.
- Mohammadimehr M, Feizabadi M, Bahadori A. Antibiotic resistance pattern of Gram negative Bacilli Caused nosocomial infections in ICUs in khanevadeh and golestan hospital in Tehran -2007. *Ann Mil Health Sci Res* 2011;8(4):283-90.
- Jafari A, Ghane M, Arastoo S. Synergistic antibacterial effects of nano zinc oxide combined with silver nanocrystallites. *Afr J Microbiol Res* 2011;5(30):5465-73.
- Esmailzadeh H, Sangpour P, Khaksar R, Shahraz F. The Effect of ZnO Nanoparticles on the Growth of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* O157:H7. *Food Technol Nutr* 2014;11(3):21-8.
- Hoseinzadeh E, Alikhani MY, Samarghandi MR, Shirzad Siboni M. Antimicrobial potential of synthesized zinc oxide nanoparticles against

- gram positive and gram negative bacteria. *Desalination Water Treatment* 2014;52(25-27):4969-76.
35. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. *Medical Microbiology*. 25th ed. New York: McGraw-Hil; 1998. p. 73.
36. Janiszewska J, Swieton J, Lipkowski AW, Urbanczyk-Lipkowska Z. Low molecular mass peptide dendrimers that express antimicrobial properties. *Bioorg Med Chem Lett* 2003;13(21):3711-3.
37. Adams LK, Lyon DY, Alvarez PJ. Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions. *Water Res* 2006;40(19):3527-32.
38. Rincón AG, Pulgarin C. Bactericidal action of illuminated TiO₂ on pure *Escherichia coli* and natural bacterial consortia: post-irradiation events in the dark and assessment of the effective disinfection time. *Appl Catal B: Environ* 2004;49(2):99-112.

Nano polyamidoamine-G7 dendrimer synthesis and assessment the antibacterial effect in vitro

Mitra Gholami Ph.D.¹
Shahram Nazari Ph.D. Student^{2*}
Mahdi Farzadkia Ph.D.¹
Seyed Mohsen Mohseni M.Sc.³
Soudabeh Alizadeh Matboo B.Sc.⁴
Fakhraddin Akbari Dourbash M.Sc.⁵
Meysam Hasannejad Ph.D. Student⁶

1- Department of Environmental Health Engineering, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

2- Department of Environmental Health Engineering, School of Public Health, Member of Student Research Committee, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

3- Department of Environmental Health Engineering, School of Public Health, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran.

4- Department of Environmental Health Engineering, School of Public Health, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran.

5- Department of Materials Science and Engineering, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

6- Department of Microbiology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

* Corresponding author: Department of Environmental Health Engineering, School of Public Health, Iran University of Medical Sciences, Hemmat High Way, Tehran, Iran.
Tel: +98 21 86704633
E-mail: shahramnazari73@yahoo.com

Abstract

Received: 13 Feb. 2016 Accepted: 20 Apr. 2016 Available online: 19 May 2016

Background: Nano scale dendrimers are macromolecules synthetic which frequently used in medical and health field. Because traditional antibiotics inevitably induce bacterial resistance, which is responsible for many treatment failures, there is an urgent need to develop novel antibiotic drugs. This study was aimed to examine Synthesis and the antibacterial effect of NanoPolyamidoamine-G7 (NPAMAM-G7) dendrimer on *Escherichia Coli*, *Proteus Mirabilis*, *Salmonella Typhi*, *Bacillus Subtilis* and *Staphylococcus Aureus*.

Methods: In this experimental study that has been conducted in June 2015 in the Laboratory of Microbiology, Iran University of Medical Science, NPAMAM-G7 dendrimers was synthesized by Tomalia's divergent growth approach. The antibacterial effects of NPAMAM-G7 dendrimer were studied by disc diffusion and micro-dilution method. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) against gram-positive and gram-negative bacteria were determined according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guideline. Standard discs were prepared using different concentrations of dendrimer on Mueller-Hinton agar plates.

Results: Zone of inhibition in concentration 25 µg/ml of NPAMAM-G7 dendrimers for *Escherichia Coli*, *Proteus Mirabilis*, *Salmonella Typhi*, *Bacillus Subtilis* and *Staphylococcus Aureus* were 26, 38, 36, 22 and 25 mm, respectively. Regarding the zone of inhibition in gram negative bacteria with gram positive ones was P= 0.16 and was not significant difference. The MIC for *Salmonella Typhi* was 0.025, for *Proteus Mirabilis*, *Bacillus Subtilis*, *Staphylococcus Aureus* and *Escherichia Coli* was 0.25 µg/ml. The MBC for *Salmonella Typhi* was 25µg/ml, for *Proteus Mirabilis* and *Bacillus Subtilis* was 50 µg/ml and for *Escherichia Coli* and *Staphylococcus Aureus* was 100 µg/ml. The least of sensitivity against NPAMAM-G7 related to *Escherichia Coli* and *Staphylococcus Aureus* and the most of sensitivity related to *Salmonella Typhi*.

Conclusion: The NPAMAM-G7 dendrimer with end amine groups exhibited a positive impact on the removal of standard strains, gram-positive and gram-negative bacteria. Therefore, it is possible to use these nanodendrimers as antibacterial in the future.

Keywords: anti-bacterial agents, microbial sensitivity tests, PAMAM, polyamidoamine, dendrimers.